

# 태안반도 기름 유출사고 이후 인근해안에 서식하는 굴 (*Crassostrea gigas*) 간췌장 (digestive gland) 의 미세구조 변화에 관한 연구

전제천, 강세원<sup>1</sup>, 백문기<sup>1</sup>, 정지은<sup>1</sup>, 신윤경, 박영제<sup>2</sup>, 한연수<sup>3</sup>, 이용석<sup>1</sup>

국립수산과학원 양식관리과, <sup>1</sup>인제대학교 의과대학 기생충학교실, <sup>2</sup>바다녹색산업연구소

<sup>3</sup>전남대학교 농업생명과학대학 식물생명공학부

## A study on the effects of an artificial oil-spill on the ultrastructural changes in the digestive glands of *Crassostrea gigas*

Je Cheon Jun, Se-Won Kang<sup>1</sup>, Moon-Ki Baek<sup>1</sup>, Ji Eun Jeong<sup>1</sup>, Yun Kyung Shin, Young Je Park<sup>2</sup>, Yeon Soo Han<sup>3</sup> and Yong Seok Lee<sup>1</sup>

Aquaculture management Division, NFRDI, Busan 619-705, Korea

<sup>1</sup>Department of Parasitology, College of Medicine and UHRC, Inje University, Busan, 614-735, Korea

<sup>2</sup>Sea Green Industry Institute, Bucheon, Gyeonggi-do, 420-851, Korea

<sup>3</sup>Department of Agricultural Biology, College of Agriculture and Life Science, Chonnam National University, Gwangju 500-757, Korea

### ABSTRACT

The unwanted artificial oil-spill has severely contaminated the coastal environment in the world. Level of contamination has so far been monitored by various indicator species including mussel, oysters, flounder, and cockle. In this study, we decided to use the oyster as a model organism to observe the morphological changes being exposed to the artificial oil-spill in the coastal areas in Taean, Korea. The oysters were collected from four local sites (Sindu-ri, Uiwang-ri, Jonghyeon-dong, Ansan and Uihang-ri) exposed to various levels of pollution after an oil spill in Taean. Microscopic analysis of the hepatopancreatic microstructure in the digestive gland from the collected oysters show that the swelling, whorl, and destruction phenomenon of the nuclear membrane, a well-known microstructure induced by heavy metal exposure, was observed. Nuclear body (Nb), another typical characteristic of contamination or infection were also observed in some samples. Necrosis was observed in tissue samples collected from the area with a high degree of oil pollution. In addition, parasite-like particles (virus, perkinsus) were observed in most samples. Taken together, these results suggest that oil contamination in the oyster habitats influences the cytopathological changes in *Crassostrea gigas*.

**Key Words:** oil spill, oyster, ultrastructure, digestive gland, *Crassostrea gigas*

### 서론

연안생태계는 광범위한 지역을 포괄하는 용어로서 인간의 활동이 가장 활발한 지역으로, 여러 종류의 오염물질 즉 생활

하수, 공장폐수 등이 유입되어 생태계에 서식하는 생물들이 대량으로 폐사하는 사태가 벌어지고 있다 (Lee *et al.*, 2006). 특히, 인공적인 유류 오출 사고 등이 해양의 연안생태계에 매우 치명적인 결과를 초래한다는 사실은 이미 잘 알려진 사실이다. 특히 전 세계적으로 유조선, 연료탱크나 선박사고 등에 의한 ‘oil spill’ 사건은 현재까지 총 119건이 보고되어있다 (Wikipedia). 이러한 유류 오출 사건의 심각성은 1979년 멕시코만 유전시설인 Ixtoc I 기름유출 사건 때 유출되었던 기름이 30년이 지난 시점에서도 발견되는 충격적인 보고가 있었는데 이를 통해 유류 오출에 의한 완전복구가 얼마나 어려운 것

Received February 5, 2011; Revised February 10, 2011; Accepted February 28, 2011

Corresponding author: Yong Seok Lee

Tel: +82 (51) 890-6462 e-mail: yslee@inje.ac.kr

1225-3480/24380

인지를 깨닫게 하고 있다 (Schrope, 2010).

여러가지 오염원들로부터 바다환경을 모니터링 하기 위해 mussel watch program을 중심으로 (Page *et al.*, 2005), *Chameleo gallina* (striped venus), (Diaz-Mendez *et al.*, 1998), 가자미, 가리비, 도다리 (Barsiene *et al.*, 2006), 새조개 (Carro *et al.*, 2006), 삿갓조개류 (Boehm *et al.*, 2007), 굴, 총알고둥 등 많은 종류의 생물들이 지표종 (indicator species)으로 사용 되어왔으며 이러한 생물이 잘 살지 못하는 극지지방의 경우에는 남극큰따조개 (Choi *et al.*, 2001 Lee *et al.*, 2002 Choi *et al.*, 2003 Choi *et al.*, 2003), 남극삿갓조개 (Lee *et al.*, 2006) 등으로 지표종을 바꾸어 사용하는 경우도 있었다.

이러한 지표종을 대상으로 하여 유류 오출 사건 전후를 비교하는 실험 및 사고해역 주변의 오염되지 않은 지역과 오염지역을 비교하는 연구 등이 진행되어 왔다. 중요한 oil spill사건 중 하나인 1989년 3월 23일, Alaska의 Prince William Sound에서 발생한 Exxon Valdez 사건을 들 수 있는데 10년이 지난 1999년, 오염된 Prince William 해협 지역의 해안과 오염되지 않은 해협 내 해안가로부터 담치류인 *Mytilus trossulus* (Boehm *et al.*, 2005) 등을 채집하여 조직에서 Polynuclear aromatic hydrocarbon (PAH) 의 농도와 생리학적 반응도 (byssal thread production, condition index, clearance rate, and glycogen content) 등을 측정, 비교하기도 하였으며 (Thomas *et al.*, 1999 Thomas *et al.*, 1999 Boehm *et al.*, 2004 Boehm *et al.*, 2005 Page *et al.*, 2005) 1991년 걸프만 oil spill 의 분석을 위해 기름 유출 전후 (1990-1994) *Lunella coronatus* (달팽이류) 및 Pearl oyster, *Pinctada radiata*의 중금속 오염도를 측정하여 기름 유출이 해양환경 오염에 미치는 영향을 조사한 사례도 있는데 조직 samples에서 금속이온, copper (Cu), nickel (Ni), lead (Pb) and zinc (Zn)의 농도가 현저히 높음을 보고한 바 있다 (Bu-Olayan and Subrahmanyam, 1997).

그러므로 유류 오출에 따라 오염지역에 중금속 농도가 증가하면 그 지역에 서식하는 연체동물의 경우 척추동물의 간에 해당하는 소화선 (digestive gland)에 여러가지 중금속이 축적되며 이에 따라 미세구조 또한 변화될 것임을 추측할 수 있다 (Lee *et al.*, 2002 Lee *et al.*, 2006 Lee *et al.*, 2006). 이에 본 연구에서는 2007년 12월 7일 태안반도에서의 기름 유출 사고 이후 오염정도가 서로 다른 지역 (신두리, 의왕리, 안산 중현동 및 의왕리)에 서식하는 굴을 시기별로 채집한 후 간체장(digestive gland)의 미세구조 변화를 관찰하여 유류오출 사고에 의한 영향을 알아보고자 하였다.

## 실험재료 및 방법

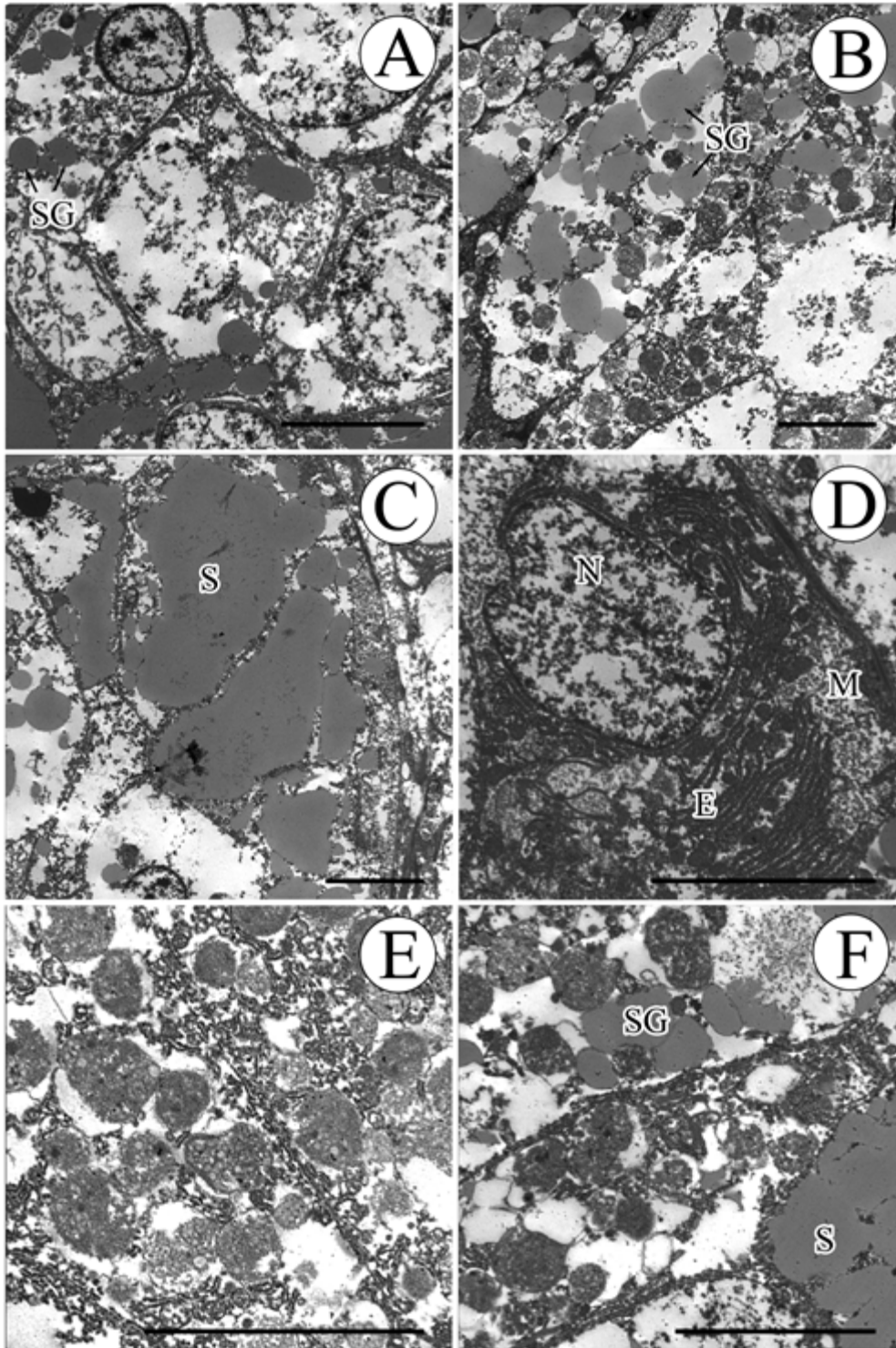
### 1. 실험재료

재료로 사용된 굴 (*Crassostrea gigas*)은 연체동물 문 (Mollusca), 이매패 강(Bivalvia), 굴 목(Ostreoida), 굴 과 (Ostreidae)에 속하는 종으로 우리나라 전역에 분포하는 종이다. 실험에 사용된 시료들은 오염 정도가 서로 다른 지역에 서식하는 개체들 간의 미세구조 비교를 위하여 2008년 3-8월 사이에 태안군의 신두리와 의왕리에서 실험군 샘플을, 안산 중현 및 경기도 의왕리에서 대조군을 채집하였다. 각 지역별로 채집된 샘플들은 실험실로 옮긴 후 해부현미경하에서 간체장 (hepatopancreas)을 적출하여 Karnovsky's fixative solution에 고정하였다

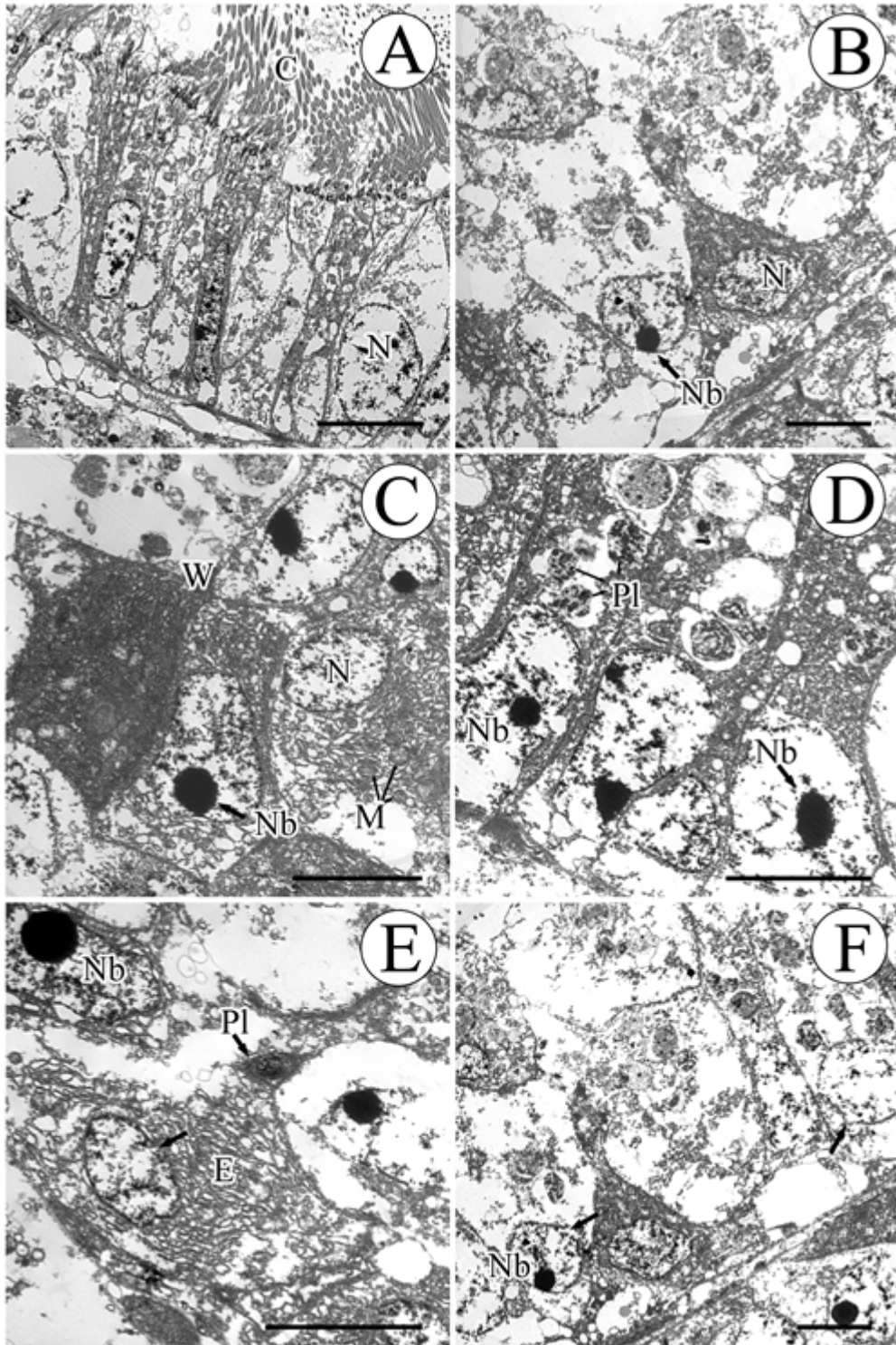
### 2. 투과전자현미경용 표본 제작

미세구조 관찰을 위하여 투과전자현미경용 초박절편을 제작하였다. 고정된 시료를 0.1 M phosphate buffer (pH 7.4)에 10분간 3회 수세를 하였다. 적당한 크기로 세절한 후 2% OsO<sub>4</sub>에 1시간 동안 후 고정하고 0.1 M phosphate buffer (pH 7.4)에 각각 10분간 3회 수세하였다. 에탄올 농도 상승 순으로 탈수를 하였고, 아세톤 농도 상승 순으로 투명화를 시켰다. spurr:acetone 비율을 1:2, 1:1, 2:1, Spurr 순으로 치환을 한 후 spurr에 포매하여 블록을 제작하였다. 60°C에서 3일간 열 중합반응을 시켜 블록을 굳힌 후 완전히 굳은 블록을 ultramicrotome (Leica) 을 이용하여 초박절편을 얻었다. 초박절편을 uranyl acetate와 lead citrate로 이중염색 하여 에너지과형 투과전자현미경 (Libra 120, ZEISS)으로 관찰하였다.

2008년 3월에 의왕리에서 채집한 굴 샘플의 경우에는 전반적으로 분비과립 (SG ; secretary granule) 및 분비과립이 합쳐진 형태의 분비과립체 (S ; spherule)이 매우 많이 관찰되었다 (Fig. 1). 세포내 빈 공간이 많이 관찰되고 초기형태의 whorl 이 간혹 발견되어 완전히 청정한 상태에서 관찰되어지는 굴의 소화선 미세구조와는 조금 달랐다. 하지만 오염지역에서 관찰되는 핵막의 swelling 현상 및 바이러스 및 perkinsus 등의 포자충 등에 감염 (infection)된 흔적 등은 찾아보기 힘들었다. 반면 2008년 3월에 태안군 신두리에서 채집한 굴 샘플의 경우에는 분비과립보다는 핵막이 파열 (rupture)현상을 관찰할 수 있었으며 오염 또는 바이러스 및 perkinsus 등에 감염 때 전형적으로 관찰되어지는 것으로 알려진 핵봉입체 (Nb ; neclear body) 및 whorl 등이 관찰되었으며 핵막이 swelling 되어진 부분들도 관찰되었다 (Fig. 2). 특히 세포의 미세구조가 아닌 감염체의 구조로 생각되어지는 parasite



**Fig 1.** Transmission electron micrographs of the digestive gland of Oyster (Euiwang-ri, March, 2008). **A, B, C** and **F**, The cell shows the secretory granule (SG) and spherule (S); **D**, The cell shows the nucleus (N), mitochondria (M) and endoplasmic reticulum (E).



**Fig 2.** Transmission electron micrographs of the digestive gland of Oyster (Sindu-ri, March, 2008). **A**, The cell shows the cilia (C); **B** and **F**, The cell shows the nucleus (N) and nuclear body (Nb); **C**, The cell shows the whorl (W) and mitochondria (M); **D**, The cell shows the parasite like particle (Pl).

**Table 1.** The ultrastructure comparison between exposed and control samples.

collect site remark	Sindu-ri (exposed)	Euiwang-ri (control)	Sindu-ri (exposed)	Ansan, Jonghyeon (control)	Euihang-ri (exposed)	Jonghyeon (control)
month	March		May		August	
Tissue status	---	+	--	+	-	++
Nuclear body (Nb) whorl	+++	++	+	+	++	+
Nuclear Membrane Status (swell)	R	-	R	+	++	+
Symptom of Infection	+	-	+	+	+	+

like (PI) particle 이 발견되었다 (Fig. 2-D, E). 하지만 이 구조물의 정체는 EELS (Electron Energy Loss Spectroscopy), EDXS (Energy Dispersive X-ray Spectroscopy) 또는 PCR (Polymerase Chain Reaction), 항체(antibody) 등을 이용한 검증이 더 필요하다.

**결과 및 고찰**

2008년 5월에 안산, 종현에서 채집한 굴 샘플의 경우 3월에 채집한 의왕리에서 채집한 샘플에 비해 조직 사이 빈 공간이 좁아들어가는 했지만 핵봉입체 (Nb ; nuclear body)를 가지는 등의 전반적인 미세구조의 양상은 비슷하였다 (Fig. 3). 하지만 3월 샘플에서 보기 힘들었던 whorl 현상, 핵막의 swelling 현상이 관찰되었다. 하지만 같은 시기에 채집한 신두리 샘플은 조직이 전반적으로 괴사상태로 미세구조의 관찰이 어려웠다. 하지만 관찰된 일부 조직에서는 핵봉입체가 관찰되었으며 핵막이 rupture 된 부분 등이 관찰되었다. 또한 virus로 생각 되는 parasite like (PI) particle도 발견되었다 (Fig. 4).

2008년 8월에 안산, 종현에서 채집한 굴 샘플의 경우 같은 지역에서 5월에 채집한 샘플에 비해 전반적으로 매우 좋은 상태로 관찰되었다. 특히 분비과립이 매우 많이 관찰되었다. 하지만 핵봉입체가 간혹 발견되었으며, 아주 드물지만 핵막이 swelling 되는 경우도 있었다. 또한 5월 샘플과 마찬가지로 parasite like (PI) particle도 발견되었다 (Fig. 5). 2008년 의항리에서 채집되어진 샘플의 경우는 오염지역 주변임에도 불구하고 조직의 상태는 3, 5월에 채집된 샘플에 비해 전반적으로 매우 좋은 상태를 보여주었다. 하지만 핵봉입체가 많이 존재하였으며 핵막의 swelling 현상 및 whorl 현상이 발견되었으며 parasite like (PI) particle도 발견되었다 (Fig. 6).

3-5월 샘플에 비해 8월의 샘플이 좋아 보이는 것은 굴의 산

란시기인 6-8월 시기에 생리활성이 높기 때문인 이유와도 연관이 있으므로, 오염물질 및 감염에 대한 세포생물학적 마커인 핵봉입체, whorl, 핵막의 swelling 현상 및 parasite like particle 등의 미세구조를 더 주의깊게 관찰하여야 할 것으로 생각된다. 또한 관찰된 parasite like particle (virus, perkinsus) 의 정체를 밝히기 위해서 EELS (Electron Energy Loss Spectroscopy), EDXS (Energy Dispersive X-ray Spectroscopy). 또한 세포 괴사 혹은 병리학적 바이오 마커가 되는 유전자의 특이적 프라이머를 이용하여 PCR (Polymerase Chain Reaction) 방법으로 확인하거나, 항체 (antibody)를 이용한 후속 실험이 요구 된다.

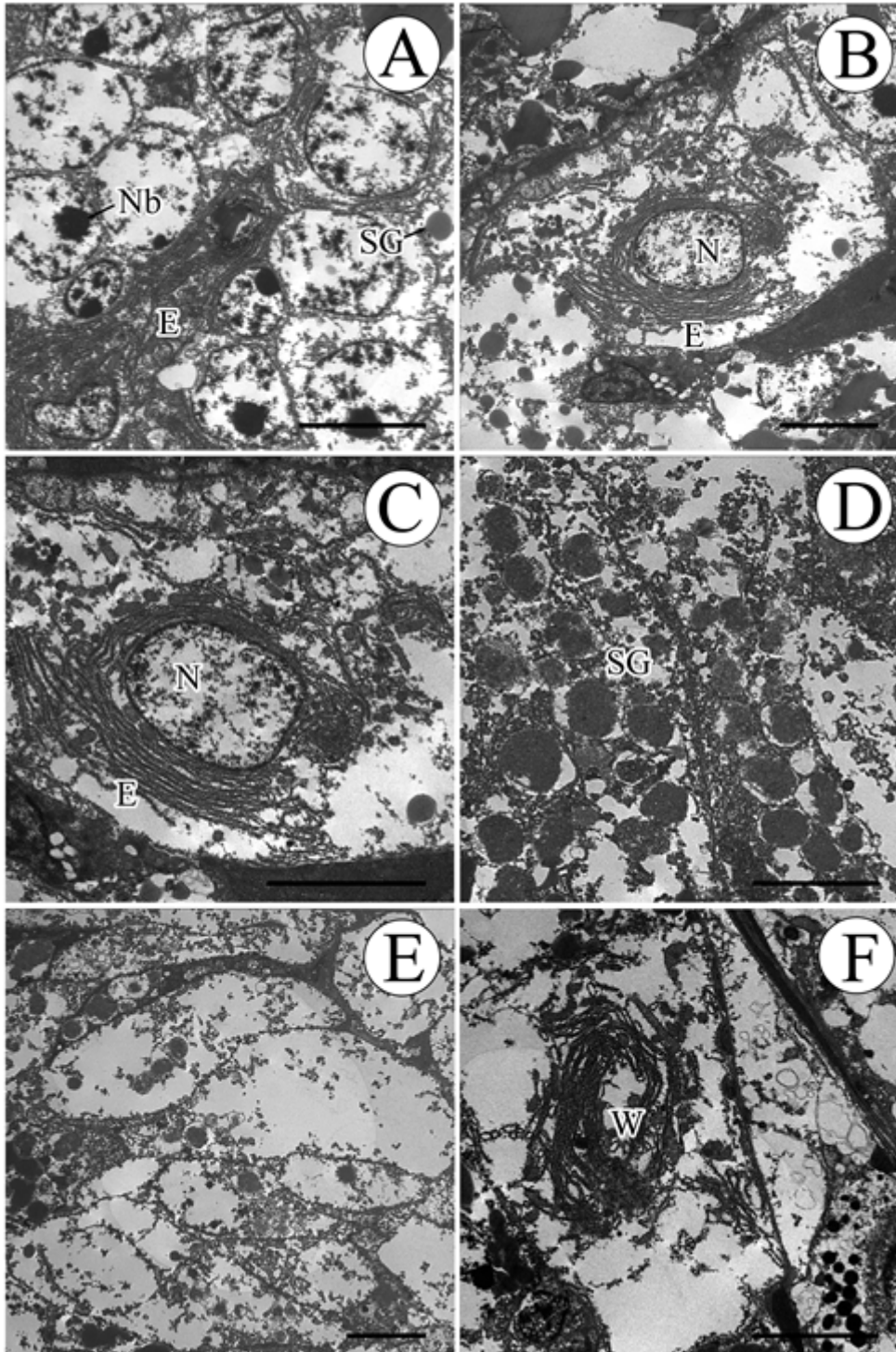
전반적으로 대조군에 비해 실험군의 조직상태가 비교적 좋지 않았으며 세포생물학적 마커의 출현비율이 적었지만 대조군의 샘플도 다소 오염물질에 노출된 양상을 보였으며 infection 의 징후는 거의 모든 샘플에서 관찰할 수 있었으나 그 종류와 양상이 다르게 관찰되어 후속실험을 통해 검증이 필요하다고 생각된다.

**사 사**

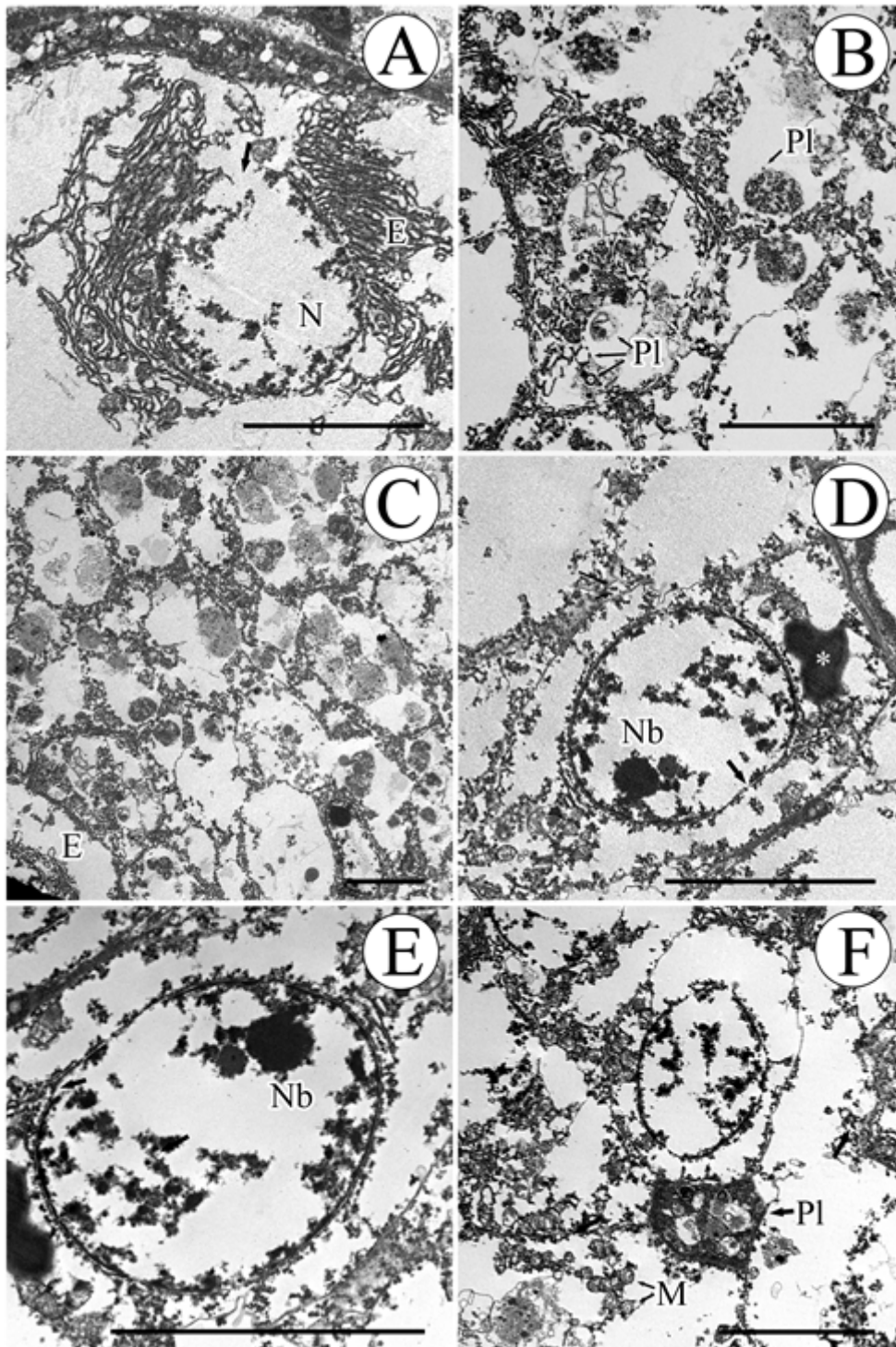
이 연구는 국립수산과학원 (RP-2011-AQ-023)의 지원에 의하여 수행되었습니다.

**Appendix**

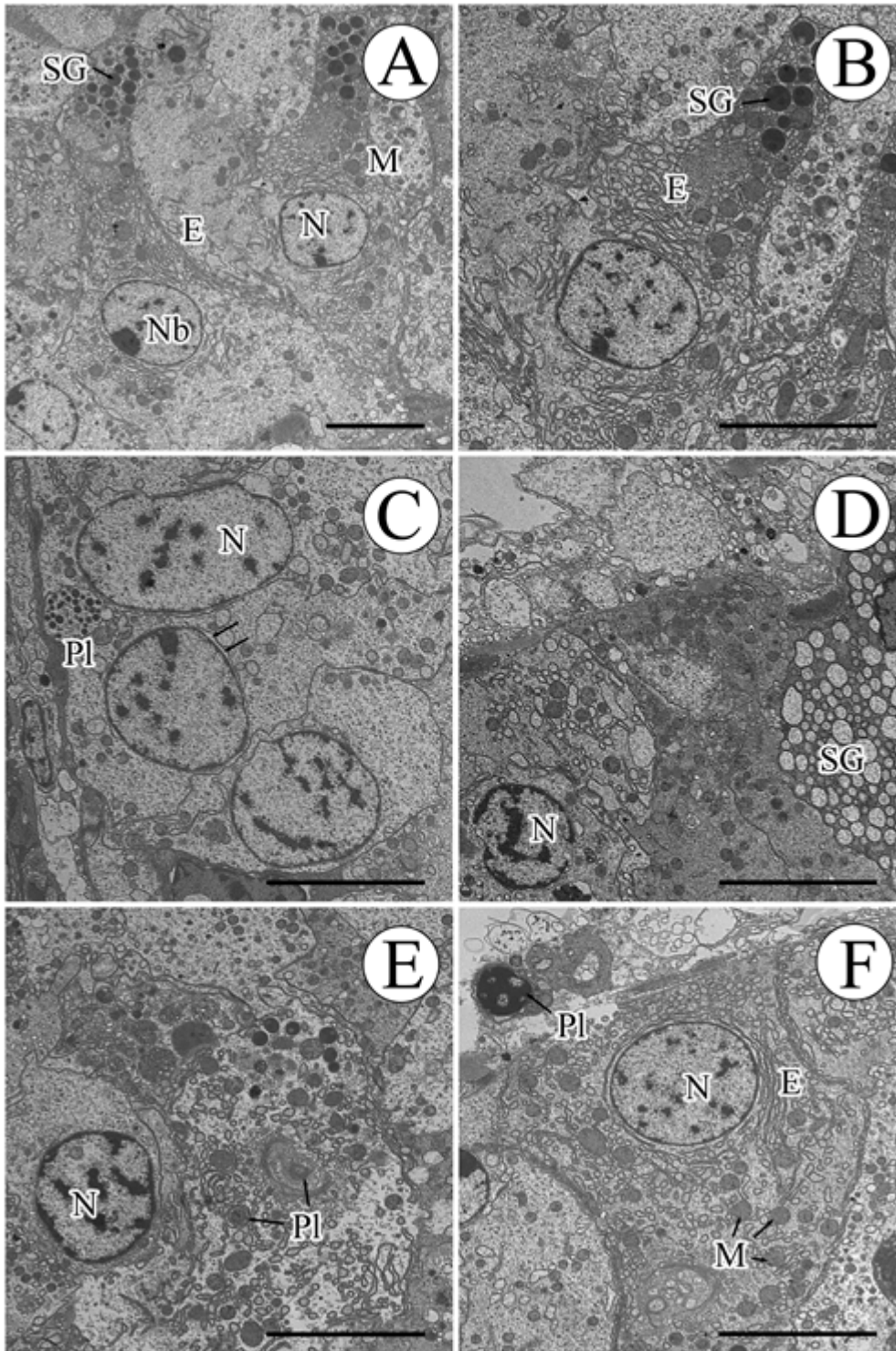
Full name	abbreviation
secretary granule	SG
spherule	S
nucleus	N
mitochondria	M
endoplasmic reticulum	E
cilia	C
nuclear body	Nb
whorl	W
parasite like particle	PI



**Fig 3.** Transmission electron micrographs of the digestive gland of Oyster (Jonghyeon, May, 2008). **A**, The cell shows the nuclear body (Nb), secretory granule (SG) and endoplasmic reticulum (E). **B** and **C**, The cell shows the nucleus (N); **D**, The cell shows the secretory granule (SG); **E**, The cell shows the several secretory granules (SG) **F**, The cell shows the whorl (W).

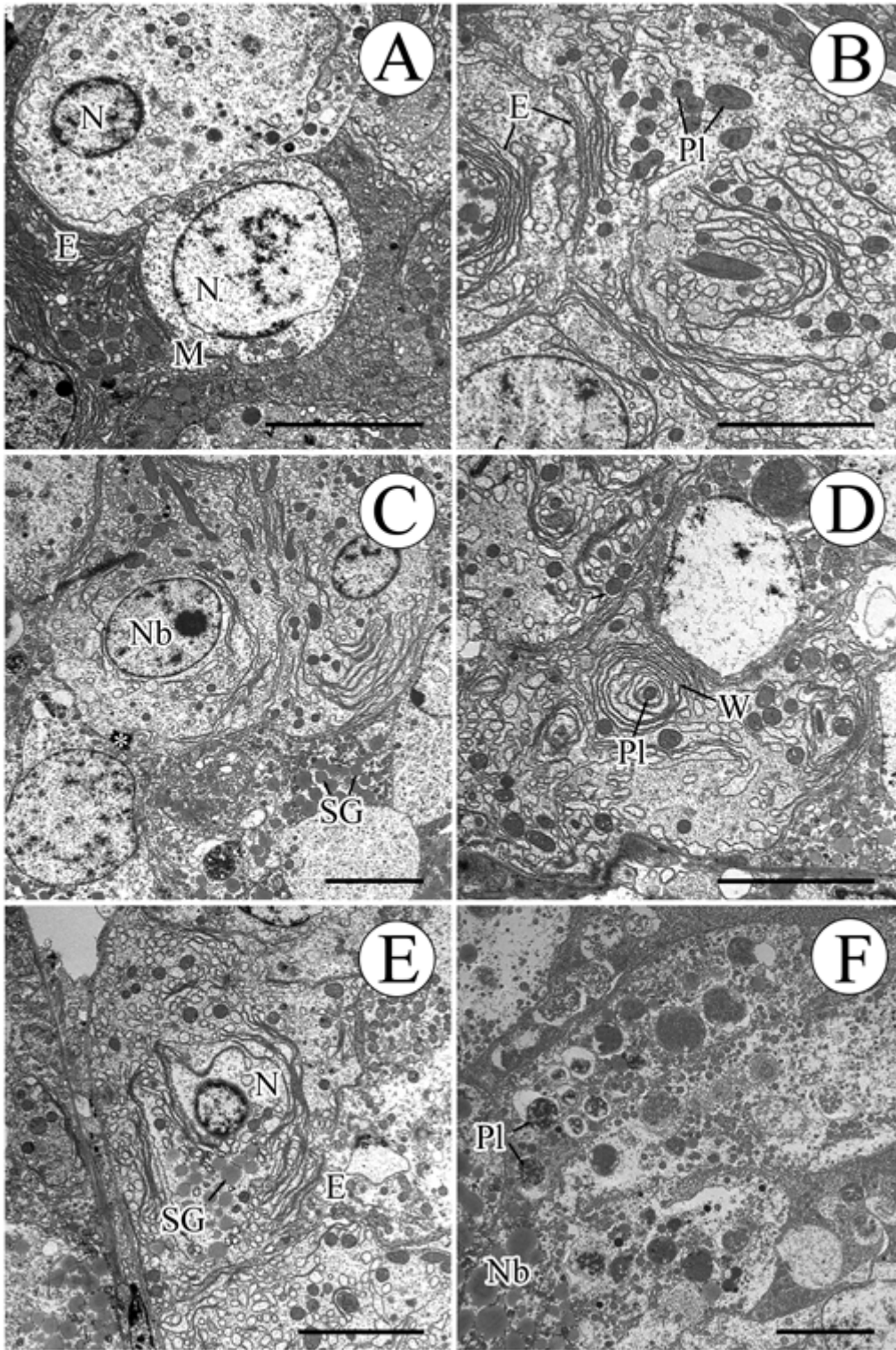


**Fig 4.** Transmission electron micrographs of the digestive gland of Oyster (Sindu-ri, May, 2008). **A** and **C**, The cell shows the nucleus(N) and endoplasmic reticulum(E); **B** and **F**, The cell shows the parasite like particle(Pl) and mitochondria(M); **D** and **E**, The cell shows the nuclear body (Nb)



**Fig 5.** Transmission electron micrographs of the digestive gland of Oyster (Jonghyeon, August, 2008). **A, B** and **D**, The cell shows the nuclear body (Nb), secretory granule (SG), mitochondria (M) and endoplasmic reticulum (E). **C**, The cell shows the swollen nuclear membranes; **E** and **F**, The cell shows the nucleus (N) and parasite like particle (Pl).





**Fig 6.** Transmission electron micrographs of the digestive gland of Oyster (Euihang-ri, August, 2008). **A**, The cell shows the nucleus (N), mitochondria (M) and endoplasmic reticulum (E). **B**, and **F**, The cell shows the parasite like particle (PI); **C** and **E**, The cell shows the secretory granule (SG) and nuclear body (Nb); **D**, The cell shows the whorl (W).

## REFERENCES

- Barsiene, J., Schiedek, D., Rybakovas, A., Syvokiene, J., Kopecka, J., and Forlin, L. (2006) Cytogenetic and cytotoxic effects in gill cells of the blue mussel *Mytilus* spp. from different zones of the Baltic Sea. *Mar Pollut Bull*, **53**: 469-478.
- Boehm, P.D., Neff, J.M., and Page, D.S. (2007) Assessment of polycyclic aromatic hydrocarbon exposure in the waters of Prince William Sound after the Exxon Valdez oil spill: 1989-2005. *Mar Pollut Bull*, **54**: 339-356.
- Boehm, P.D., Page, D.S., Brown, J.S., Neff, J.M., and Burns, W.A. (2004) Polycyclic aromatic hydrocarbon levels in mussels from Prince William Sound, Alaska, USA, document the return to baseline conditions. *Environ Toxicol Chem*, **23**: 2916-2929.
- Boehm, P.D., Page, D.S., Brown, J.S., Neff, J.M., and Edward Bence, A. (2005) Comparison of mussels and semi-permeable membrane devices as intertidal monitors of polycyclic aromatic hydrocarbons at oil spill sites. *Mar Pollut Bull*, **50**: 740-750.
- Bu-Olayan, A.H., and Subrahmanyam, M.N. (1997) Accumulation of copper, nickel, lead and zinc by snail, *Lunella coronatus* and pearl oyster, *Pinctada radiata* from the Kuwait coast before and after the Gulf War oil spill. *Sci. Total Environ*, **197**: 161-165.
- Carro, N., Cobas, J., and Maneiro, J. (2006) Distribution of aliphatic compounds in bivalve mollusks from Galicia after the Prestige oil spill: spatial and temporal trends. *Environ Res*, **100**: 339-348.
- Choi, H.J., Ahn, I.Y., Kim, K.W., Lee, Y.S., Lee, I.S., and Jeong, K.H. (2003) Subcellular accumulation of Cu in the Antarctic bivalve *Laternula elliptica* from a naturally Cu-elevated bay of King George Island. *Polar biology*, **26**: 601-609.
- Choi, H.J., Ahn, I.Y., Lee, Y.S., Kim, K.W., and Jeong, K.H. (2003) Histological Responses of the Antarctic Bivalve *Laternula elliptica* to a Short-term Sublethal-level Cd Exposure. *Ocean polar research*, **25**(2): 147-154.
- Choi, H.J., Ahn, I.Y., Ryu, S.K., Lee, Y.S., Lee, I.S., and Jeong, K.H. (2001) Preliminary Evidence for a Metallothionein-like Cd-binding Protein in the Kidney of the Antarctic Clam *Laternula elliptica*. *Ocean polar research*, **23**(4): 337-345.
- Diaz-Mendez, F.M., Rodriguez-Ariza, A., Usero-Garcia, J., Pueyo, C., and Lopez-Barea, J. (1998) Mutagenic activation of aromatic amines by molluscs as a biomarker of marine pollution. *Environ Mol Mutagen*, **31**: 282-291.
- Lee, Y.S., Ahn, I.Y., Kim, W.J., and Jeong, K.H. (2002) An Immunohistochemical and Ultrastructural Study of the Heavy Metals accumulated in the kidney of an Antarctic Clam, *Laternula elliptica*. *The Korean Journal of Malacology*, **18**(1): 15-21.
- Lee, Y.S., Jo, Y.H., Byun, I.S., Kang, S.W., Cho, E.M., Han, Y.S., Choi, S.H., Park, H.S., Kho, W.G., Ahn, I.Y., and Jeong, K.H. (2006) Bioaccumulation of Heavy Metals in *Ruditapes philippinarum*. *Korean Journal of Malacology*, **22**: 157-165.R
- Lee, Y.S., Jo, Y.H., Han, Y.S., Kho, W.G., Ahn, I.Y., and Jeong, K.H. (2006) Bioaccumulation of Heavy Metals in Intestine of *Nacella concinna*. *The Korean Journal of Malacology*, **22**: 83-91.
- Page, D.S., Boehm, P.D., Brown, J.S., Neff, J.M., Burns, W.A., and Bence, A.E. (2005) Mussels document loss of bioavailable polycyclic aromatic hydrocarbons and the return to baseline conditions for oiled shorelines in Prince William Sound, Alaska. *Mar Environ Res*, **60**: 422-436.
- Schrope, M. (2010) The lost legacy of the last great oil spill. *Nature*, **466**: 304-305.
- Thomas, R.E., Brodersen, C., Carls, M.G., Babcock, M., and Rice, S.D. (1999) Lack of physiological responses to hydrocarbon accumulation by *Mytilus trossulus* after 3-4 years chronic exposure to spilled Exxon Valdez crude oil in Prince William Sound. *Comp Biochem Physiol C Pharmacol Toxicol Endocrinol*, **122**: 153-163.
- Thomas, R.E., Harris, P.M., and Rice, S.D. (1999) Survival in air of *Mytilus trossulus* following long-term exposure to spilled Exxon Valdez crude oil in Prince William Sound. *Comp Biochem Physiol C Pharmacol Toxicol Endocrinol*, **122**: 147-152.